

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
31. Dezember 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/000881 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07K 14/415**,  
C12N 15/11, 15/63, A61K 38/16, 39/36, 48/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/006092

(22) Internationales Anmeldedatum:  
11. Juni 2003 (11.06.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
02013953.1 25. Juni 2002 (25.06.2002) EP

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): **MERCK PATENT GMBH** [DE/DE]; Frankfurter  
Strasse 250, 64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FIEBIG, Helmut**  
[DE/DE]; Bäckerweg 10, 21493 Schwarzenbek (DE).  
**NANDY, Andreas** [DE/DE]; Nüsslerkamp 89, 22175  
Hamburg (DE). **SUCK, Roland** [DE/DE]; Gellerstrasse  
15, 22301 Hamburg (DE). **CROMWELL, Oliver**  
[GB/DE]; Loenshöhe 2, 21465 Wentorf (DE). **PE-  
TERSEN, Arnd** [DE/DE]; Kiekut 8, 23795 Bad Segeberg  
(DE). **BECKER, Wolf-Meinhard** [DE/DE]; Dorfstrasse  
53, 23975 Mözen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: **MERCK PATENT GMBH**;  
Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,  
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten  
Fassung: 26. Februar 2004

(15) Informationen zur Berichtigung:  
siehe PCT Gazette Nr. 09/2004 vom 26. Februar 2004,  
Section II

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: DNA SEQUENCE AND RECOMBINANT PRODUCTION OF THE GRASS POLLEN ALLERGEN PHL P4

(54) Bezeichnung: DNA-SEQUENZ UND REKOMBINANTE HERSTELLUNG DES GRASPOLLEN-ALLERGENS PHL P4

(57) Abstract: The invention relates to the provision of the gene sequence of the grass pollen main allergen Phl p 4. The invention also includes fragments, novel combinations of partial sequences and point mutants having a hypoallergenic effect. The recombinant DNA molecules and the derived polypeptides, fragments, novel combinations of partial sequences and variants can be used for the therapy of pollen-allergy diseases. The recombinantly produced proteins can be used for *in vitro* and *in vivo* diagnosis of pollen allergies.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung der Gensequenz des Graspollenhauptallergens Phl p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

WO 2004/000881 A1

## **DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens Phl p 4**

### **5 Hintergrund der Erfindung**

Die vorliegende Erfindung betrifft die Bereitstellung der Gensequenz des Graspollenhauptallergens Phl p 4. Die Erfindung schließt auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein. Die rekombinanten DNA-Moleküle und die abgeleiteten  
10 Polypeptide, Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Varianten können zur Therapie von pollenallergischen Krankheiten genutzt werden. Die rekombinant hergestellten Proteine können zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

15 Allergien vom Typ 1 haben weltweite Bedeutung. Bis zu 20 % der Bevölkerung in industrialisierten Ländern leiden unter Beschwerden wie allergischer Rhinitis, Konjunktivitis oder Bronchialasthma. Diese Allergien werden durch in der Luft befindliche Allergene (Aeroallergene), die von Quellen unterschiedlicher Herkunft wie Pflanzenpollen, Milben, Katzen oder Hunden  
20 freigesetzt werden, hervorgerufen. Bis zu 40 % dieser Typ 1-Allergiker wiederum zeigen spezifische IgE-Reaktivität mit Gräserpollenallergenen (Freidhoff et al., 1986, J. Allergy Clin. Immunol. 78, 1190-2001).

Bei den Typ 1-Allergie auslösenden Substanzen handelt es sich um Protei-  
25 ne, Glykoproteine oder Polypeptide. Diese Allergene reagieren nach Aufnahme über die Schleimhäute mit den bei sensibilisierten Personen an der Oberfläche von Mastzellen gebundenen IgE-Molekülen. Werden zwei IgE-Moleküle durch ein Allergen miteinander vernetzt, führt dies zur Ausschüttung von Mediatoren (z. B. Histamin, Prostaglandine) und Zytokinen durch  
30 die Effektorzelle und damit zu den entsprechenden klinischen Symptomen.

In Abhängigkeit von der relativen Häufigkeit mit der die einzelnen Allergenmoleküle mit den IgE-Antikörpern von Allergikern reagieren, wird zwischen Major- und Minorallergenen unterschieden.

5 Im Fall vom Wiesenlieschengras (*Phleum pratense*) sind bislang Phl p 1 (Petersen et al., 1993, J. Allergy Clin. Immunol. 92: 789-796), Phl p 5 (Matthiesen und Löwenstein, 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 297-307; Petersen et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 98: 105-109), Phl p 6 (Petersen et al., 1995, Int. Arch. Allergy Immunol. 108, 49-54). Phl p 2/3 (Dolecek et al., 10 1993, FEBS 335 (3), 299-304), Phl p 4 (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268; Valenta et al., 1992, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294, Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) und Phl p 13 (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332; Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) als Hauptallergene identifiziert worden. 15

Das Phl p 4 ist als basisches Glykoprotein mit einer Molekularmasse zwischen 50 und 60 kDa angegeben worden (Haavik et al., 1985, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 78: 260-268). Das Phl p 4-Molekül ist Trypsin- 20 resistent (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198) und 70-88 % der Graspollenallergiker haben IgE-Antikörper gegen dieses Molekül (Valenta et al., 1993, Int. Arch. Allergy Immunol. 97: 287-294; Rossi et al., 2001, Allergy 56:1180-1185; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy 33:43-51). Homologe Moleküle sind aus verwandten Grasspezies beschrieben worden 25 (Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14 – 17). Diese homologen Moleküle der *Poaceae* bilden die Allergengruppe 4, deren Moleküle eine hohe immunologische Kreuzreaktivität untereinander sowohl mit monoklonalen Mausantikörpern als auch 30 mit humanen IgE-Antikörpern aufweisen (Fahlbusch et al., 1993 Clin. Exp. Allergy 23:51-60; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol.

98:1065-1072; Su et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 97:210; Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrović-Jankulović et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6): 361-367; Stümvoll et al. 2002, Biol. Chem. 383: 1383-1396; Grote et al., 2002, Biol. Chem. 383: 1441-1445;  
5 Andersson und Lidholm, 2003, Int. Arch. Allergy Immunol. 130: 87-107; Mari, 2003, Clin. Exp. Allergy, 33 (1): 43-51).

Im Gegensatz zu den oben genannten Hauptallergenen von *Phleum pratense* (Phl p 1, Phl p 2/3, Phl 5a und 5b, Phl p 6 und Phl p 13) ist die Primärstruktur des Phl p 4 noch nicht aufgeklärt. Ebenso gibt es keine vollständige Sequenz von Molekülen der Gruppe 4 aus anderen Grasspezies.  
10

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz war bisher nicht erfolgreich. Die Ursachen hierfür sind jedoch nicht bekannt. Fischer et al. (J. Allergy Clin. Immunol., 1996; 98: 189-198) vermuten eine N-terminale Blockierung, konnten aber ein internes Peptid nach Abbau mit Lysyl-  
15 Endopeptidase reinigen und dessen Sequenz bestimmen: IVALPXGMLK (SEQ ID NO 7).

Dieses Peptid weist Homologien zu Peptidsequenzen in den Ragweed-Allergenen Amb a1 und Amb a2 sowie Ähnlichkeiten zu Sequenzen in Proteinen von Mais (Zm58.2), Tomate (lat 59, lat 56) und Tabak (G10) auf (Fischer et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 189-198). Für *Lolium perenne* wurden für das basische Gruppe-4 Allergen Peptidfragmente mit der folgenden Sequenz beschrieben: FLEPVLGLIFPAGV (SEQ ID NO 8) und GLIEFPAGV (SEQ ID NO 9) (Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348).  
20  
25

Von dem Gruppe-4 Allergen aus *Dactylus glomerata* sind ebenfalls Peptide durch enzymatischen Abbau gewonnen und sequenziert worden:  
DIYNYMEPYVSK (P15, SEQ ID NO 10),  
30 VDPTDYFGNEQ (P17, SEQ ID NO 11),  
ARTAWVDSGAQLGELSY (P20, SEQ ID NO 12)

und GVLFNIIQYVNYWFAP (P22, SEQ ID NO 13) (Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072).

Auch vom Gruppe-4 Allergen des subtropischen Bermuda-Grases (*Cynodon dactylon*) sind durch Proteolyse Peptide erhalten und sequenziert worden:

KTVKPLYIITP (S, SEQ ID NO 14),

KQVERDFLTSLTKDIPQLYLKS (V49L, SEQ ID NO 15),

TVKPLYIITPITAAMI (T33S, SEQ ID NO 16),

LRKYGTAADNVIDAKVVDAQGRLL (T35L, SEQ ID NO 17),

KWQTVAPALPDPNM (P2, SEQ ID NO 18),

VTWIESVPYIPMGDK (V26L, SEQ ID NO 19),

GTVRDLLXRTSNIKAFGKY (L25L, SEQ ID NO 20),

TSNIKAFGKYKSDYVLEPIPKKS (T22L, SEQ ID NO 21),

YRDLDLGVNQVVG (P3, SEQ ID NO 22),

SATPPTHRSGLVFNII (V20L, SEQ ID NO 23),

und AAAALPTQVTRDIYAFMTPYVSKNPRQAYVNYRDL (V14L, SEQ ID NO 24) (Liaw et al., 2001, Biochem. Biophys. Research Communication 280: 738-743).

Diese beschriebenen Peptidsequenzen für Phl p 4 und Gruppe-4 Allergene haben jedoch bisher nicht zur Aufklärung der vollständigen Primärstruktur der Gruppe-4 Allergene geführt.

Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe bestand daher in der Bereitstellung der vollständigen DNA-Sequenz des Phl p 4 sowie einer entsprechenden rekombinanten DNA, auf deren Grundlage das Phl p 4-Allergen als Protein exprimiert und einer pharmakologisch bedeutsamen Verwertung als solches oder in veränderter Form zugänglich gemacht werden kann.

## Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 1:** Interne DNA-Sequenz (SEQ ID NO 25) des Phl p 4-Gens  
Mit den degenerierten Primern Nr. 30 (sense) und Nr. 37 (anti-sense), beide kursiv dargestellt, wurden mit genomischer DNA erhaltene Amplifikate kloniert und sequenziert. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Konsensus aus 6 Klonen. Der aus dieser Sequenz kreierte spezifische sense-Primer Nr. 82 ist unterstrichen dargestellt.
- Abbildung 2:** 3'-Ende der Nukleinsäuresequenz (SEQ ID NO 26) des Phl p 4-Gens  
In einer 3'-RACE PCR mit *Phleum pratense* cDNA wurden Amplifikate mit dem spezifischen sense-Primer Nr. 82 (kursiv dargestellt) sowie einem Ankerprimer gewonnen und sequenziert. Die dargestellte Sequenz repräsentiert den Konsensus aus 3 Sequenzierungen und umfasst das 3'-Ende des Phl p 4-Gens bis zum Stopp-Codon (doppelt unterstrichen). Die Sequenzbereiche, die zur Konstruktion der anti-sense-Primer Nr. 85 und Nr. 86 herangezogen wurden, sind unterstrichen dargestellt.
- Abbildung 3:** Lokalisierung der Phl p 4- Peptide in der deduzierten Aminosäuresequenz des Phl p 4-Allergens (SEQ ID NO 2)  
Die aus der Aminosäuresequenzierung des gereinigten und fragmentierten Phl p 4 Allergens erhaltenen Peptide P1 - P6 (SEQ ID NO's 27-32) lassen sich eindeutig der aus der Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz des Phl p 4-Gens zuordnen.
- Abbildung 4:** Nachweis der Identität des rekombinanten Phl p 4 (rPhl p 4) mittels der für nPhl p 4 spezifischen monoklonalen Antikörper 5H1 (Blot A) und 3C4 (Blot B) im Western Blot.
- Bahn 1: *E. coli* Gesamtzellextrakt enthaltend rPhl p 4 Fragment 1-200  
Bahn 2: *E. coli* Gesamtzellextrakt enthaltend rPhl p 4 Fragment 185-500

Bahn 3: *E. coli* Gesamtzellextrakt enthaltend rPhl p 4

Bahn 4: gereinigtes nPhl p 4 aus *Phleum pratense*

( ◀----- ): Abbruch- oder Degradationsfragmente von C-terminalem rPhl p 4-Fragment bzw. rPhl p 4 Gesamtmolekül

5

**Abbildung 5:** Nachweis der Reaktivität des rekombinanten Phl p 4 (rPhl p 4) mit IgE aus Seren von Graspollenallergikern im Western Blot.

Extrakte von transformierten *E. coli*-Zellen, die entweder das komplette Phl p 4 Gen exprimieren oder das N-terminale Fragment 1-200 bzw. das C-terminale Fragment 185-500 wurden in der SDS-PAGE getrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der Blot wurde mit Seren der graspollenallergischen Spender A, B oder C inkubiert und nachfolgend gebundenes IgE über einen anti-human-IgE Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, kolorimetrisch detektiert.

10

15

Bahn 1: *E. coli* Gesamtzellextrakt enthaltend rPhl p 4 Fragment 1-200

Bahn 2: *E. coli* Gesamtzellextrakt enthaltend rPhl p 4 Fragment 185-500

Bahn 3: *E. coli* Gesamtzellextrakt enthaltend rPhl p 4

Bahn 4: gereinigtes nPhl p 4 aus *Phleum pratense*

20

Die vor- und nachstehend verwendeten Bezeichnungen für Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen "SEQ ID NO" beziehen sich auf das der Beschreibung beigefügte Sequenzprotokoll.

25

### **Beschreibung der Erfindung**

Mit der vorliegenden Erfindung wird die Gensequenz des Graspollenhauptallergens Phl p 4 nun erstmals bereit gestellt, wobei sich aus den aufgefundenen Einzelnukleotidaustauschen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP's) drei dominierende Sequenzen (SEQ ID NO 1, 3 und 5) ergeben.

30

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 5 bzw. ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz, die für das Majorallergen Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert.

Die Erfindung schließt dabei auch Fragmente, Neukombinationen von Teilsequenzen und Punktmutanten mit hypoallergener Wirkung ein.

Gegenstand der Erfindung sind daher weiterhin entsprechende Teilsequenzen, einer Kombination von Teilsequenzen bzw. Austausch-Elimierungs- oder Additionsmutanten, welche für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-Allergens der *Poaceae* kodieren.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung sind außer den Gruppe-4 Allergenen der anderen Grasspezies die Gruppe-13 Allergene von Interesse, da sie ein den Gruppe-4 Allergenen sehr ähnliches Molekulargewicht in der SDS-PAGE zeigen und schwer durch biochemische Techniken abzutrennen sind (Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 324-332, Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402). Mit Hilfe der jetzt erstmalig vorliegenden, erfindungsgemäßen Protein- und DNA-Sequenz kann jedoch eindeutig gezeigt werden, dass die Gruppen 4 und 13 deutlich unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen.

Mit der Kenntnis der DNA-Sequenz der natürlich vorkommenden Allergene ist es nun möglich, diese Allergene als rekombinante Proteine herzustellen, die in der Diagnostik und Therapie von allergischen Erkrankungen Verwendung finden können (Scheiner and Kraft, 1995, Allergy 50: 384-391).

Ein klassischer Ansatz zur wirksamen therapeutischen Behandlung von Allergien stellt die Spezifische Immuntherapie oder Hyposensibilisierung dar (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (6): 336-339, Bousquet et al., 1998, J. Allergy



Clin. Immunol. 102(4): 558-562). Dabei werden dem Patienten natürliche Allergenextrakte in steigenden Dosen subkutan injiziert. Allerdings besteht bei dieser Methode die Gefahr von allergischen Reaktionen oder sogar eines anaphylaktischen Schocks. Um diese Risiken zu minimieren, werden  
5 innovative Präparate in Form von Allergoiden eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemisch modifizierte Allergenextrakte, die deutlich reduzierte IgE-Reaktivität, jedoch identische T-Zell-Reaktivität im Vergleich zum nicht behandelten Extrakt aufweisen (Fiebig, 1995, Allergo J. 4 (7): 377-382).

Eine noch weitergehende Therapieoptimierung wäre mit rekombinant hergestellten Allergenen möglich. Definierte, ggfs. auf die individuellen Sensibilisierungsmuster der Patienten abgestimmte Cocktails von hochreinen, rekombinant hergestellten Allergenen könnten Extrakte aus natürlichen Allergenquellen ablösen, da diese außer den verschiedenen Allergenen eine größere Zahl von immunogenen, aber nicht allergenen Begleitproteinen  
10 enthalten.

Realistische Perspektiven, die zu einer sicheren Hyposensibilisierung mit Expressionsprodukten führen können, bieten gezielt mutierte rekombinante Allergene, bei denen IgE-Epitope spezifisch deletiert werden, ohne die für die Therapie essentiellen T-Zell Epitope zu beeinträchtigen (Schramm et  
15 al., 1999, J. Immunol. 162: 2406-2414).

Eine weitere Möglichkeit zur therapeutischen Beeinflussung des gestörten TH-Zell-Gleichgewichtes bei Allergikern ist die immuntherapeutische DNA-Vakzinierung. Dabei handelt es sich um eine Behandlung mit expressionsfähiger DNA, die für die relevanten Allergene kodiert. Erste experimentelle  
25 Belege für die allergenspezifische Beeinflussung der Immunantwort konnte an Nagern durch Injektion von Allergen-kodierender DNA erbracht werden (Hsu et al., 1996, Nature Medicine 2 (5): 540-544).

30 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül bzw. ein entsprechender rekombinanter Expressionsvektor als Arzneimittel.

Die entsprechenden rekombinant hergestellten Proteine können zur Therapie sowie zur *in vitro*- und *in vivo*-Diagnostik von Pollenallergien eingesetzt werden.

5 Zur Herstellung des rekombinanten Allergens wird die klonierte Nukleinsäure in einen Expressionsvektor ligiert und dieses Konstrukt in einem geeigneten Wirtsorganismus exprimiert. Nach biochemischer Reinigung steht dieses rekombinante Allergen zur Detektion von IgE-Antikörpern in etablierten Verfahren zur Verfügung.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein rekombinanter Expressionsvektor, enthaltend ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz und ein Wirtsorganismus, transformiert mit besagtem DNA-Molekül oder besagtem Expressionsvektor.

15

Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen DNA-Moleküls oder mindestens eines zuvor beschriebenen Expressionsvektors zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

20

Wie bereits ausgeführt kann die Erfindung als eine essentielle Komponente in einem rekombinanten allergen- oder nukleinsäurehaltigen Präparat zur spezifischen Immuntherapie angewendet werden. Hierbei bieten sich mehrere Möglichkeiten. Zum einen kann das in der Primärstruktur unveränderte Protein Bestandteil des Präparates sein. Zum anderen kann durch gezielte Deletion von IgE-Epitopen des Gesamtmoleküls oder der Herstellung von einzelnen Fragmenten, die für T-Zell Epitope kodieren, erfindungsgemäß eine hypoallergene (allergoide) Form zur Therapie verwendet werden, um unerwünschte Nebenwirkungen zu vermeiden. Schließlich wird durch die

25

30

Nukleinsäure an sich, wenn sie mit einem eukaryontischen Expressionsvektor ligiert wird, ein Präparat geschaffen, das direkt appliziert den allergischen Immunzustand im therapeutischen Sinne verändert.

5 Bei der Erfindung handelt es sich somit um rekombinante DNA-Moleküle entsprechend den SEQ ID NO 1, 3 oder 5, wobei die Nukleotidsequenz der Positionen 1-69 aus der Aminosäuresequenz des Phl p 4 N-Terminus abgeleitet wurde. Dabei wurden in *E. coli* häufig vorkommende Codons verwendet. Ab Position 70 entspricht die DNA-Sequenz derjenigen, die in genomischer und cDNA von *Phleum pratense* identifiziert wurde.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein DNA-Molekül, umfassend eine Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 bzw. SEQ ID NO 5, beginnend mit der Position 70, welches für ein Polypeptid mit den Eigenschaften des Majorallergens Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert.

Desweiteren handelt es sich bei der vorliegenden Erfindung um die von einem oder mehreren der zuvor beschriebenen DNA-Moleküle kodierten Polypeptide, vorzugsweise in ihrer Eigenschaft als Arzneimittel.

20 Dabei handelt es sich insbesondere um Polypeptide gemäß SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 4 bzw. SEQ ID NO 6, wobei die Aminosäurepositionen 1-33 durch N-terminale Aminosäuresequenzierung des isolierten natürlichen Phl p 4 Allergens bestimmt wurden. Die Positionen 24-500 wurden von der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 1, 3 bzw. 5 abgeleitet. Variable Aminosäuren an den Positionen 6, 7, 8 und 9 entstammen der N-terminalen Proteinsequenzierung unterschiedlicher Präparationen des natürlichen Phl p 4 (Tab. 1).

25 Die Erfindung betrifft demgemäß auch ein Verfahren zur Herstellung solcher Polypeptide durch Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 11 und Gewinnung des entsprechenden Polypeptids aus der Kultur.

30

Ebenfalls erfindungsgegenständlich ist die Verwendung mindestens eines zuvor beschriebenen Polypeptids zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind sowie zur Prävention solcher Allergien.

Diese erfindungsgemäßen Polypeptide bzw. Proteine, welche für Menschen als Allergene wirken, sind in den Pollenkörnern von *Phleum pratense* enthalten. Die Pollenkörner der anderen *Poaceae*-Spezies, wie z.B. *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus* u.a. enthalten homologe Allergenmoleküle (Gruppe-4 Allergene). Die Homologie dieser Moleküle ist durch ihre immunologische Kreuzreaktivität sowohl mit murinen monoklonalen Antikörpern als auch mit humanen IgE-Antikörpern nachgewiesen worden.

Infolge dessen betrifft die Erfindung auch zur Phl p 4 DNA-Sequenz homologe Sequenzen bzw. entsprechende DNA-Moleküle von Gruppe-4-Allergenen aus anderen *Poaceae* wie beispielsweise *Lolium perenne*, *Dactylis glomerata*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon*, *Holcus lanatus*, *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare*, die aufgrund der bestehenden Sequenzhomologie mit der Phl p 4-DNA unter stringenten Bedingungen hybridisieren, bzw. bezüglich Phl p 4 eine immunologische Kreuzreaktivität aufweisen.

Bei der Ermittlung der Protein- und DNA-Sequenz des Phl p 4 wurde wie folgt vorgegangen:

Die Reinigung und Isolierung des natürlichen Allergens Phl p 4 erfolgte nach beschriebenen Methoden (Fahlbusch et al. 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799-807, Suck et al. 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402). Die Feinreinigung und die Abtrennung von Spuren des Allergens der Gruppe 13 er-

folgte nach der von Suck et al. (2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402) beschriebenen Methode.

Von diesem aus *Phleum pratense* isolierten Phl p 4 wurde die N-terminale Aminosäuresequenz mittels Edman-Abbau bestimmt. Mit unterschiedlichen Chargen des Phl p 4 wurden die in Tabelle 1 aufgezeigten N-terminalen Sequenzen (P1a – f) bestimmt. Als Konsensussequenz für die ersten 15 Positionen wird folgende Sequenz angesehen: YFPP'P'AAKEDFLGXL (SEQ ID NO 33). Die Position 14 konnte nicht bestimmt werden, wahrscheinlich ist sie mit einem Cystein besetzt. Die unterschiedlichen Aminosäuren auf den Positionen 6, 7, 8 und 9 bei den unterschiedlichen Chargen weisen auf Variationen im Sinne von Isoformen hin. Die Positionen 4 und 5 sind mit Hydroxyprolin (P') besetzt, was durch eine spezifische Analytik bei den Analysen der Präparate p1-a und -b eindeutig festgestellt wurde.

Durch Behandlung des SDS-denaturierten Phl p 4 mit der Endopeptidase Glu-C (Promega, Heidelberg, Germany) wurden verschiedene Peptide erhalten. Von zwei Peptiden (P2 und P3) wurden die in Tabelle 1 gezeigten Aminosäuresequenzen bestimmt. Durch Spaltung mit der Endopeptidase Lys-C (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden 2 Peptide (P4 und P5) gereinigt und sequenziert (Tab. 1). Durch CNBr-Spaltung wurde ein weiteres Peptid (P6) isoliert und die Aminosäuresequenz ermittelt (Tab.1).

Die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Sequenz und der internen Peptide 2 und 6 wurden als Grundlage für die Konstruktion von degenerierten Primern benutzt. Mit dem Sense-Primer Nr. 30 und dem Anti-Sense-Primer Nr. 37 (Tab. 2) wurden mit genomischer DNA aus *Phleum pratense* Amplifikate hergestellt. Die von diesen Amplifikaten gewonnenen Klone wurden sequenziert (Abb. 1) und zur Konstruktion des spezifischen Sense-Primers Nr. 82 benutzt (Tab. 2). Mit einer cDNA, die aus der repräsentativen mRNA-Population aus *Phleum pratense*-Pollen hergestellt wurde, und dem erfindungsgemäßen spezifischen Sense-Primer Nr. 82 sowie dem An-

kerprimer AUAP (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) wurde eine PCR unter stringenten Bedingungen durchgeführt. Dieses Amplifikat von ca. 450 kb wurde sequenziert und somit die fehlende Sequenz bis zum 3'-Ende des Phl p 4-Genes identifiziert (Abb. 2). Basierend auf dieser erfindungsgemäß bestimmten C-terminalen Phl p 4-Sequenz wurden die spezifischen Anti-Sense-Primer Nr. 85 und Nr. 86 konstruiert (Tab. 2). Basierend auf der N-terminalen Aminosäuresequenz des Phl p 4-Peptids P1-a (Tab. 1) wurde der degenerierte Sense-Primer Nr. 29, abgeleitet von der DNA kodierend für die Aminosäurepositionen 24-33 (LYAKSSPAYP (SEQ ID NO 34)), konstruiert.

Mit den Primern Nr. 29 und Nr. 86 wurde mit genomischer *Phleum pratense*-DNA eine PCR durchgeführt. Dieses PCR-Produkt wurde als Grundlage für eine zweite PCR (nested PCR) mit den Primern Nr. 29 und Nr. 85 eingesetzt. Die Amplifikate wurden in den Vektor pGEM T-easy (Promega, Heidelberg, Deutschland) inseriert, kloniert und sequenziert. Diese Sequenz beginnt an der Position 24 vom N-Terminus gerechnet bzw. Position 70 der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 1, 3 oder 5 und reicht bis zum Primer Nr. 85, (Position 1402 in SEQ ID NO 1, 3 oder 5) der im schon bestimmten C-terminalen Abschnitt des Phl p 4-Genes lokalisiert ist. Mit diesen Daten kann die vollständige Aminosäuresequenz des Phl p 4-Moleküles aus den durch Proteinsequenzierung bestimmten ersten 33 Aminosäurepositionen und der deduzierten Aminosäuresequenz (477 Positionen), die aus den mit den Primern Nr. 29/Nr. 85 und Nr. 82/Anker-Primer hergestellten Klonen abgeleitet werden kann, konstruiert werden. Die beiden Klone überlappen in 197 Positionen ihrer Nukleotidsequenz. Das vom Klon Nr. 29/Nr. 85 kodierte Peptid überlappt auf 10 Aminosäurepositionen mit der durch direkte Aminosäuresequenzierung bestimmten N-terminalen Sequenz (Positionen 1-33) des Phl p 4, wobei die mit beiden Methoden bestimmten Aminosäuren übereinstimmen.

Die Aminosäuresequenz des Phl p 4 basierend auf den direkt bestimmten N-terminalen Aminosäuren und der deduzierten Aminosäuresequenz entspricht den unter den SEQ ID NO 2, 4 bzw. 6 im Sequenzprotokoll aufgeführten Sequenzen.

5

Mit dem spezifischen Sense-Primer Nr. 88 (Tab. 2) und dem spezifischen Anti-Sense-Primer Nr. 86 wurden sowohl mit genomischer als auch mit cDNA von *Phleum pratense* PCR-Produkte hergestellt und direkt sequenziert.

10

Hierdurch ist es möglich, PCR-Fehler auszuschliessen und genetische Variationen (single nucleotide polymorphisms) aufzudecken.

Die gefundenen Einzelnukleotidaustausche zur DNA-Sequenz SEQ ID NO 1 sind in Tabelle 3 aufgeführt. Einige dieser Einzelnukleotidaustausche führen zu veränderten Aminosäuren. Diese sind in Tabelle 4 dargestellt. Es wurden weiterhin DNA-Klone sequenziert, die zu abweichenden Aminosäuren in Bezug auf die dominierenden Sequenzen SEQ ID NO 2, 4 und 6 führen (Tab. 5).

15

Diese Aminosäurevariationen sind als Isoformen des Phl p 4-Moleküles anzusehen. Die Existenz solcher Isoformen ist aufgrund des heterogenen isoelektrischen Verhaltens des natürlichen Phl p 4 zu erwarten. Alle bisher bekannten Pollenallergene weisen solche Isoformen auf. Dass das DNA-Stück, welches mit den Primern Nr. 29 und 86 bestimmt wurde, tatsächlich für ein Protein kodiert, welches mit dem natürlichen Phl p 4-Allergen identisch ist, kann unter anderem auch dadurch bewiesen werden, dass für die identifizierten internen Peptide P3, P4 und P5 (Tab. 1) des natürlichen Phl p 4 homologe Peptidsequenzen in der deduzierten Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen rekombinanten Phl p 4-Moleküls gefunden werden (Abb. 3). Die beschriebene Aminosäuresequenz des Phl p 4 zeigt, dass es sich um ein basisches Molekül mit einem kalkulierten isoelektrischen Punkt von 8,99 (SEQ ID NO 2), 8,80 (SEQ ID NO 4) bzw. 9,17 (SEQ ID NO 6), bestehend aus 500 Aminosäuren, handelt. Die quantitative Aminosäurezusammensetzung ist in Tabelle 6 dargestellt. Das berechnete Molekularge-

20

25

30

wicht des rekombinanten Phl p 4 beträgt 55.762 (SEQ ID NO 2), 55.734 (SEQ ID NO 4) bzw. 55.624 (SEQ ID NO 6) Dalton. Diese berechnete Molekularmasse stimmt sehr gut mit der durch SDS-PAGE bestimmten Molekularmasse des natürlichen Phl p 4, für das 55 kDa bestimmt wurden, überein (Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28: 799 -807 und Suck et al., 2000, Clin. Exp. Allergy 30: 1395-1402).

Auch für die Gruppe-4 Allergene verwandter Grasspezies wurden Molekularmassen zwischen 50 und 60 kDa beschrieben (Su et al., 1991, Clin. Exp. Allergy 21: 449-455; Jaggi et al., 1989, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 89: 342-348; Jaggi et al., 1989, J. Allergy Clin. Immunol. 83: 845-852; Leduc-Brodard et al., 1996, J. Allergy Clin. Immunol. 98: 1065-1072; 14 – 17).

Zur Herstellung des rekombinanten Phl p 4-Proteins wurde die für Phl p 4-kodierende DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO 1, 3 und/oder 5 in Expressionsvektoren (z.B. pProEx, pλCro, pSE 380) eingebaut. Für die aus der Proteinsequenzierung bekannten N-terminalen Aminosäuren wurden *E. coli* optimierte Codons verwendet.

Nach der Transformation in *E. coli*, der Expression und der Reinigung des rekombinanten Phl p 4 durch verschiedene Trenntechniken wurde das erhaltene Protein einem Refoldingprozess unterworfen.

Dieses so gewonnene rPhl p 4-Protein ergibt eine einzelne Bande in der SDS-PAGE, die im gleichen Molekulargewichtsbereich wie das natürliche Phl p 4 wandert., Die immunologische Reaktivität des rPhl p 4 konnte durch die Reaktion mit den murinen monoklonalen Antikörpern 5H1 und 3C4, die mit natürlichem Phl p 4 induziert worden waren und mit den homologen Proteinen (Gruppe 4) der *Poaceae* kreuzreagieren (Fahlbusch et al., 1998, Clin. Exp. Allergy 28:799-807; Gavrović-Jankulović et al., 2000, Invest. Allergol. Clin. Immunol. 10 (6): 361-367), nachgewiesen werden (Abb. 4).

Das rPhl p 4 reagiert mit IgE-Antikörpern von Allergikern, die nachgewiese-



ne IgE-Reaktivität mit natürlichem Phl p 4 haben. Diese IgE-Reaktivität und damit die Wirkung als Allergen konnte sowohl im Dot-Test, Western-Blot als auch nach Adsorption des Allergens an Polystyren-Mikrotiterplatten nachgewiesen werden. Der Nachweis im Western-Blot ist in Abbildung 5  
5 gezeigt. Bei Reaktion des rPhl p 4 mit Basophilen von Allergengruppe 4-reaktiven Graspollenallergikern werden diese zur verstärkten Expression des Aktivierungsmarkers CD 203c angeregt. Diese Basophilenaktivierung durch rPhl p 4 zeigt deutlich, dass dieses Molekül auch funktionell als Allergen wirkt.

10 Damit kann dieses rPhl p 4-Allergen zur hochspezifischen Diagnostik von Graspollenallergikern eingesetzt werden. Diese Diagnostik kann *in vitro* durch die Detektion von spezifischen Antikörpern (IgE, IgG1 - 4, IgA) und die Reaktion mit IgE-beladenen Effektorzellen (z. B. Basophile aus dem Blut) oder *in vivo* durch Hauttest-Reaktionen und Provokation am Reaktionsorgan erfolgen.  
15

Die Reaktion des rPhl p 4 mit T-Lymphozyten von Graspollenallergikern konnte durch die allergenspezifische Stimulierung der T-Lymphozyten zur Proliferation und Zytokinsynthese sowohl mit T-Zellen in frisch präparierten  
20 Blutlymphozyten als auch an etablierten nPhl p 4-reaktiven T-Zell-Linien und -Klonen nachgewiesen werden.

Basierend auf der dargelegten DNA-Sequenz des rPhl p 4 wurden Teilsequenzen kodierend für Peptide von 50 bis 350 Aminosäuren in Expressionsvektoren kloniert. Diese Teilsequenzen decken sequentiell die vollständige Sequenz des rPhl p 4 ab, wobei Überlappungen von mindestens 12 Aminosäuren vorkommen. Die exprimierten Peptide entsprechen Phl p 4-Fragmenten. Diese Phl p 4-Fragmente reagieren einzeln oder als Gemisch mit den IgE-Antikörpern von Allergikern nicht oder nur in geringem Grade,  
25 so dass sie als hypoallergen eingestuft werden können. Im Gegensatz dazu ist das Gemisch dieser Fragmente in gleicher Weise wie das vollständi-  
30

ge rekombinante oder natürliche Phl p 4 zur Stimulierung von T-Lymphozyten von Graspollenallergikern mit Phl p 4-Reaktivität fähig. Abbildung 4 zeigt als Beispiel die Charakterisierung zweier solcher Phl p 4-Fragmente, entsprechend den Aminosäuren 1-200 und 185-500 durch die Bindung an Phl p 4-spezifische monoklonale Mausantikörper. Das C-terminale Fragment 185-500 reagiert nur mit dem nonoklonalen Antikörper 5H1, während das N-terminale Fragment 1-200 eindeutig mit dem monoklonalen Antikörper 3C4 reagiert. Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, daß das Fragment 185-500 weniger stark mit dem IgE aus den Seren der Allergiker B und C reagiert, also weniger allergen ist als das Fragment 1-200, welches zumindest gegenüber dem Patientenserum C eine herabgesetzte IgE-Reaktivität (Hypoallergenität) aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, kodierend für ein Fragment 1-200, mit den Aminosäuren 1-200 des Phl p 4, sowie ein DNA-Molekül kodierend für ein Fragment 285-500, mit den Aminosäuren 285-500 des Phl p 4.

Durch ortsgerichtete Mutagenese wurden die für die Cysteine kodierenden Tripletts so verändert, dass sie für andere Aminosäuren, bevorzugt Serin, kodieren. Es wurden sowohl Varianten hergestellt, bei denen einzelne Cysteine ausgetauscht wurden, als auch solche, bei denen verschiedene Kombinationen von 2 Cysteinresten bzw. alle 5 Cysteine verändert wurden. Die exprimierten Proteine dieser Cysteinpunktmutanten weisen eine stark reduzierte bzw. fehlende Reaktivität mit IgE-Antikörpern von Allergikern auf, reagieren jedoch mit den T-Lymphozyten dieser Patienten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher weiterhin ein vor- oder nachstehend beschriebenes DNA-Molekül, bei dem durch ortsgerichtete Mutagenese einer, mehrere oder alle der Cystein-Reste des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure ausgetauscht wurden.

Die immunmodulatorische Aktivität der hypoallergenischen Fragmente, die Polypeptiden mit T-Zell-Epitopen entsprechen, sowie die der hypoallergenischen Punktmutanten (z.B. Cystein-Austausche) ist durch ihre Reaktion mit T-Zellen von Graspollenallergikern nachgewiesen.

5

Solche hypoallergenischen Fragmente bzw. Punktmutanten der Cysteine können als Präparate zur Hyposensibilisierung von Allergikern eingesetzt werden, da sie mit gleicher Effektivität mit den T-Zellen reagieren, jedoch aufgrund der verminderten oder ganz fehlenden IgE-Reaktivität zu geringeren IgE-vermittelten Nebenwirkungen führen.

10

Werden die für die hypoallergenischen Phl p 4-Varianten kodierenden Nukleinsäuren oder die unveränderte für Phl p 4 kodierende DNA mit einem humanen Expressionsvektor ligiert, können diese Konstrukte ebenfalls als Präparate für eine Immuntherapie (DNA-Vakzinierung) angewendet werden.

15

Schließlich sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend mindestens ein zuvor beschriebenes DNA-Molekül oder mindestens einen zuvor beschriebenen Expressionsvektor und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.

20

25

Eine weitere Gruppe von erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitungen enthält anstelle der DNA mindestens ein zuvor beschriebenes Polypeptid und eignet sich zur Diagnose und/oder Behandlung besagter Allergien.

30

Pharmazeutische Zubereitungen im Sinne der vorliegenden Erfindung enthalten als Wirkstoffe ein erfindungsgemäßes Polypeptid oder einen Ex-

- pressionsvektor und/oder deren jeweilige pharmazeutisch verwendbaren Derivate, einschließlich deren Mischungen in allen Verhältnissen. Hierbei können die erfindungsgemäßen Wirkstoffe zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und
- 5 gegebenfalls in Kombination mit einem oder mehreren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.
- Als Hilfsstoffe sind immunstimulierende DNA oder Oligonukleotide mit CpG-Motiven besonders geeignet.
- 10 Diese Zubereitungen können als Therapeutika oder Diagnostika in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die parenterale Applikation eignen und die Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs nicht negativ beeinflussen. Zur parenteralen Anwendung dienen
- 15 insbesondere Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate. Der erfindungsgemäße Wirkstoff kann auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Kon-
- 20 servierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffersubstanzen und/oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten.
- Weiterhin können durch entsprechende Formulierung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs Depotpräparate erhalten werden.
- 25 Die Erfindung dient somit auch zur Verbesserung der *in vitro* Diagnostik im Rahmen einer Allergen-Komponenten auflösenden Identifizierung des patientenspezifischen Sensibilisierungsspektrums. Die Erfindung dient ebenfalls zur Herstellung von deutlich verbesserten Präparaten zur spezifischen
- 30 Immuntherapie von Gräserpollenallergien.

**Tabelle 1 Aminosäuresequenz von Phl p 4-Peptiden**

Präparat	Peptid Charge	SEQ ID NO	Aminosäuren					
			1	6	11	16	21	26 31
Intaktes Phl p 4	P1-a	35	YFPP'P'	AAKED	FLGXL	VKEIP	PRLLY	AKSSP AYP
	P1-b	36	YFPP'P'	AAKED	FLGXL	VKE-P	PRLLY	AKSSP
	P1-c	37	YFPXX	AAKED	FLGXL			
	P1-d	38	YFPXX	AKKED	FLGXL			
	P1-e	39	YFPXX	AAKDD	FLGXL			
	P1-f	40	YFPXX	LANED	F			
Glu-C-Fragmente	P2	41	SATPF	XHRKG	VLFNI	QYV		
	P3	42	GLXYR	XLXPE				
Lys-C-Fragmente	P4	43	KXMGD	DHFXA	VR			
	P5	44	APEGA	VDI I				
CNBr-Fragment	P6	45	MEPYV	SINPV	QAYAN	Y		

**Tabelle 2 Degenerierte und spezifische Sense- und Anti-Sense-Primer, die auf der Grundlage von Phl p 4 Peptidsequenzen und DNA-Sequenzen konstruiert wurden**

Primer Nr.	Peptid/ DNA	Sense/ Anti-Sense	SEQ ID NO	Nukleotidsequenz
29	Phl p 4-P1	s	46	YTN TAY GCN AAR WSN WSN CCN GCN TAY CC
30	Phl p 4-P2	s	47	CAY MGN AAR GGN GTN YTN TTY AAY ATM C
37	Phl p 4-P6	as	48	TAR TTN GCR TAN GCY TGN ACN GGR TT
82	Phl p 4-DNA-NYW	s	49	ACT ACT GGT TCG CCC CGG GAG CC
85	Phl p 4-DNA-GLV	as	50	TGA AGT ATT TCT GGC CCC ACA CCA AAC C
86	Phl p 4-DNA-QRL	as	51	CCC TTG GTG ATG GCG AGC CTC TGG
88	Phl p 4-DNA-PSV	s	52	CTC AGT CCT GGG GCA GAC CAT CC

Die Nukleotidsequenzen der Primer 82, 85, 86 und 88 ist in dem üblichen 4-Buchstaben-Code dargestellt. Bei den Primern 29, 30 und 37 wird der IUPAC-IUB-DNA-Code verwendet; der Buchstabe 'N' steht hier für Inosin.

**Tabelle 3 Detektierte Einzelnukleotidaustausche**

	Position in Sequenz	Nukleotid gemäß SEQ ID NO 1	Detektierte SNPs
5	85	T	A
	130	C	A
	159	G	A
	160	A	C
	169	G	A
	185	C	T
10	186	C	A
	222	G	C
	226	G	A
	227	G	C
	228	T	C
	237	C	T
	273	C	T
15	285	C	T
	286	C	T
	298	G	A
	299	A	C
	303	C	T
	309	C	G
	318	T	C
20	320	G	A
	333	C	G
	348	G	C
	369	C	G
	409	C	T
	411	C	T
	420	T	C
25	421	A	C
	423	A	C
	424	G	A
	425	T	C
	456	C	G
	462	C	A
	522	G	C
	525	C	G
30	567	G	A
	618	C	T
	655	A	C

5	657	G	A
	662	G	A
	680	C	T
	684	G	C
	690	C	A
10	691	G	A
	693	G	A
	703	C	T, A
	710	A	C
	711	G	A
15	713	C	T
	743	G	A
	750	G	A
	768	C	T
	773	A	C
20	790	G	A
	798	G	C
	801	G	A
	804	C	G
	809	C	A
25	834	G	C
	844	C	A
	859	A	T
	865	A	G
	879	G	C
30	895	G	C
	900	G	C, A
	918	G	A
	961	A	G
	962	A	C
	964	A	C
	987	G	C
	994	A	T
	1020	G	A
	1023	G	C
	1036	G	C
	1040	C	T
	1041	G	C
	1047	C	A
	1051	A	G
	1052	G	A, C
	1053	G	A, C, T
	1056	G	C
	1069	T	C
	1073	G	A
	1084	C	G

5	1086	G	C
	1090	C	T
	1098	G	C
	1151	G	C
	1152	G	C
	1155	G	C
	1161	G	C
	1185	C	G
	1229	G	C
	1233	G	C
	1239	A	C
	1240	T	C
	1242	G	C
10	1257	G	C
	1266	C	T
	1269	C	T
	1278	A	C, G
	1305	C	G
	1308	C	T
	1311	C	A
15	1335	G	C
	1350	G	C
	1357	T	A
	1359	A	G
	1370	G	C
	1377	T	C
	1378	T	A
20	1379	T	A
	1383	G	C
	1398	C	T
	1411	T	C
	1414	C	G
	1425	C	A
	1428	C	T
25	1443	G	C
	1449	C	T
	1464	G	A
	1485	G	A
	1498	A	C

30

Tabelle 4

**Aminosäureaustausche, infolge von Einzelnukleotidaustauschen**



	Position in Sequenz	Aminosäure gemäß SEQ ID NO 2	Detektierte Austau- sche
5	6	A	L
	7	A	K
	8	K	N
	9	E	D
	29	S	T
10	54	I	L
	57	V	I
	62	A	V
	76	G	T, N, S
	100	E	T
15	107	S	N
	137	H	Y
	141	T	P
	142	V	A, T
	189	T	K
20	219	K	Q
	221	R	K
	227	P	L
	231	V	I
	235	P	T, S
25	237	K	T
	238	A	V
	248	R	K
	258	D	A
	264	V	I
30	270	T	K
	282	Q	K
	287	M	L
	289	S	G
	299	A	P
	321	N	A
	322	I	L
	332	T	S
	346	E	Q
	347	P	L
	351	R	E, T
	357	F	L
	358	S	N
	362	L	V
	364	P	S
	384	W	S
	410	G	A
	419	E	D

456	F	Y
457	S	A, N
460	L	K
468	K	M
472	Q	E
498	K	Q

5

**Tabelle 5 Abweichende Aminosäurepositionen bei einzelnen rekombinanten Phl p 4-Klonen gegenüber SEQ ID NO 2**

	<b>Beispiel</b>	<b>Abweichende Positionen*</b>
10	Klon 1	L54, I57, V62, S76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, L227, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
15	Klon 2	L54, I57, V62, T76, T100, N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
	Klon 3	P141, K282, L287, P299, L347, E351
	Klon 4	G289, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
	Klon 5	L347, E351, S384, A410, D419, Y456, A457, K460, E472
20	Klon 6	N107, Y137, P141, T142, K189, Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384, A410, D419, Y456, A457, K460
	Klon 7	K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, L357, N358, V362, S384
	Klon 8	Q219, K221, I231, S235, T237, V238, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, E351
25	Klon 9	M231, T246, A251, C263, G289, L307, L309, E334
	Klon 10	Q219, K221, I231, S235, T237, M238, V242, V246, K248, A258, I264, K270, K282, L287, P299, A321, L322, S332, Q346, P347, T351, N358, V362, S384, Insertion GA zwischen Position 407 und 408, N452, Y456, A457, K460, E472
	Klon 11	Insertion GA zwischen Position 407 und 408

30 \* [Aminosäure gemäß SEQ ID NO 2 / Position in Sequenz / Abweichende Aminosäure]

**Tabelle 6 Aminosäurezusammensetzung des Phl p 4**

	<b>Aminosäuren</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Gewichts-%</b>
	Geladene	138/138/138	33,89/33,86/33,93
	Säure	45/46/43	9,82/10,05/9,38
	Basische	54/53/55	13,67/13,39/13,78
5	Polare	120/119/124	24,88/24,71/25,89
	Hydrophobe	180/180/180	35,64/35,66/35,43
	A Ala	40/40/41	5,10/5,10/5,24
	C Cys	5/5/5	0,92/0,93/0,93
	D Asp	24/24/24	4,95/4,96/4,97
	E Glu	21/22/19	4,86/5,10/4,41
	F Phe	24/24/22	6,33/6,34/5,82
10	G Gly	42/42/40	4,30/4,30/4,10
	H His	10/10/9	2,46/2,46/2,22
	I Ile	29/29/30	5,88/5,89/6,10
	K Lys	29/29/33	6,67/6,67/7,60
	L Leu	33/33/35	6,70/6,70/7,12
	M Met	11/11/10	2,59/2,59/2,36
	N Asn	22/22/23	4,50/4,50/4,72
15	P Pro*	38/39/39	6,62/6,80/6,81
	Q Gln	15/15/15	3,45/3,45/3,46
	R Arg	25/24/22	7,00/6,73/6,18
	S Ser	32/32/33	5,00/5,00/5,17
	T Thr	22/21/22	3,99/3,81/4,00
	V Val	41/41/40	7,29/7,29/7,13
	W Trp	13/13/12	4,34/4,34/4,02
20	Y Tyr	24/24/26	7,02/7,03/7,63

\* einschließlich Hydroxyprolin

Die Werte sind für die drei dominierenden Sequenzen in der Reihenfolge  
SEQ ID NO 2 / SEQ ID NO 4 / SEQ ID NO 6 angegeben.

25

30

### Patentansprüche

- 5 1. Ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 3 und SEQ ID NO 5.
- 10 2. Ein DNA-Molekül, umfassend eine Nukleotidsequenz gemäß Anspruch 1 beginnend mit der Position 70, welches für ein Polypeptid mit den Eigenschaften des Majorallergens Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert.
- 15 3. Ein DNA-Molekül entsprechend einer Nukleotidsequenz, die für das Majorallergen Phl p 4 aus *Phleum pratense* kodiert.
4. Ein DNA-Molekül, das mit einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3 unter stringenten Bedingungen hybridisiert und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
- 20 5. Ein DNA-Molekül, kodierend für ein Polypeptid, welches mit dem Majorallergen Phl p 4 aus *Phleum pratense* immunologisch kreuzreagiert, und von DNA-Sequenzen von *Poaceae*-Spezies abstammt.
- 25 6. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Teilsequenz oder einer Kombination von Teilsequenzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, welche für ein immunmodulatorisches, T-Zell-reaktives Fragment eines Gruppe-4-*Poaceae*-Allergens kodiert.
- 30 7. Ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 6, kodierend für ein Phl p 4 Fragment, ausgewählt aus einer Gruppe bestehend aus
  - Fragment 1-200, mit den Aminosäuren 1-200 des Phl p 4,
  - Fragment 185-500, mit den Aminosäuren 185-500 des Phl p 4.

- 5 8. Ein DNA-Molekül, entsprechend einer Nukleotidsequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, kodierend für ein immunmodulatorisches T-Zell reaktives Fragment, dadurch gekennzeichnet, daß besagte Nukleotidsequenz durch gezielte Mutation einzelner Codons, Eliminierung oder Addition gezielt verändert wurde.
- 10 9. Ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die besagte Mutation zum Austausch eines, mehrerer oder aller Cysteine des entsprechenden Polypeptids gegen eine andere Aminosäure führt.
- 15 10. Ein rekombinanter DNA-Expressionsvektor oder ein Klonierungssystem, enthaltend ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, funktionell verbunden mit einer Expressionskontrollsequenz.
- 20 11. Ein Wirtsorganismus, transformiert mit einem DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 oder einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 10.
- 25 12. Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids, kodiert durch eine DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9, durch Kultivieren eines Wirtsorganismus gemäß Anspruch 11 und Gewinnung des entsprechenden Polypeptids aus der Kultur.
- 30 13. Ein Polypeptid, welches von einer DNA-Sequenz gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 kodiert wird.
14. Ein Polypeptid gemäß Anspruch 13 als Arzneimittel.
15. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein Polypeptid gemäß Anspruch 14 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind.

Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind.

- 5 16. Verwendung mindestens eines Polypeptids gemäß Anspruch 14 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Diagnose und/oder Behandlung von Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.
- 10 17. Ein DNA-Molekül gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 9 als Arzneimittel.
18. Ein rekombinanter Expressionsvektor gemäß Anspruch 10 als Arzneimittel.
- 15 19. Eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend mindestens ein DNA-Molekül gemäß Anspruch 17 oder mindestens einen Expressionsvektor gemäß Anspruch 18 und gegebenenfalls weitere Wirk- und/oder Hilfsstoffe zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.
- 20 20. Verwendung mindestens eines DNA-Moleküls gemäß Anspruch 17 oder mindestens eines Expressionsvektors gemäß Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur immuntherapeutischen DNA-Vakzinierung von Patienten mit Allergien, an deren Auslösung Gruppe-4-Allergene der *Poaceae* beteiligt sind und/oder zur Prävention solcher Allergien.
- 25

**Abb. 1      Interne DNA-Sequenz des Phl p 4-Gens**

C A C C G G A A G G G G G T G C T G T T C A A C A T C C A G T A C G T C A A  
C T A C T G G T T C G C C C C G G G A G C C G G C G C G G C G C C A T T G T  
C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C T A C A T G G A G C C G T A C  
G T G A G C A A G G A C C C C G T C C A G G C C T A C G C C A A C T A

**Abb. 2     3'-Ende der Nukleinsäuresequenz des Phi p 4-Gens**

A C T A C T G G T T C G C C C C G G G A G C C G G C G C G G C  
G C C A T T G T C G T G G A G C A A G G A G A T C T A C A A C  
T A C A T G G A G C C A T A C G T G A G C A A G A A C C C C A  
G G C A G G C C T A C G C C A A C T A C A G G G A C A T C G A  
C C T C G G G A G G A A C G A G G T G G T G A A C G A C G T C  
T C C A C C T T C A G C A G C G G T T T G G T G T G G G G C C  
A G A A A T A C T T C A A G G G C A A C T T C C A G A G G C T  
C G C C A T C A C C A A G G G C A A G G T G G A T C C C A C C  
G A C T A C T T C A G G A A C G A G C A G A G C A T C C C G C  
C G C T C A T C A A A A A G T A C T G A



### Abb. 3 Lokalisierung der Phl p 4- Peptide in der deduzierten Aminosäuresequenz des Phl p 4-Allergens

1 Y F P P P A A K E D F L G C L V K E I P P R L L Y A K S S P A Y P S V L G Q T I  
Y F P P P A A K E D F L G X L V K E I P P R L L Y A K S S P A Y P  
**Peptid P1**

41 R N S R W S S P D N V K P I Y I V T P T N A S H I Q S A V V C G R R H G V R I R  
 81 V R S G G H D Y E G L S Y R S L Q P E E F A V V D L S K M R A V W V D G K A R T  
GLX Y R X L X P E  
**Peptid P3**

121 A W V D S G A Q L G E L Y Y A I H K A S T V L A F P A G V C P T I G V G G N F A  
 161 G G G F G M L L R K Y G I A A E N V I D V K L V D A N G T L H D K K S M G D D H  
K X M G D D H  
**Peptid P4**

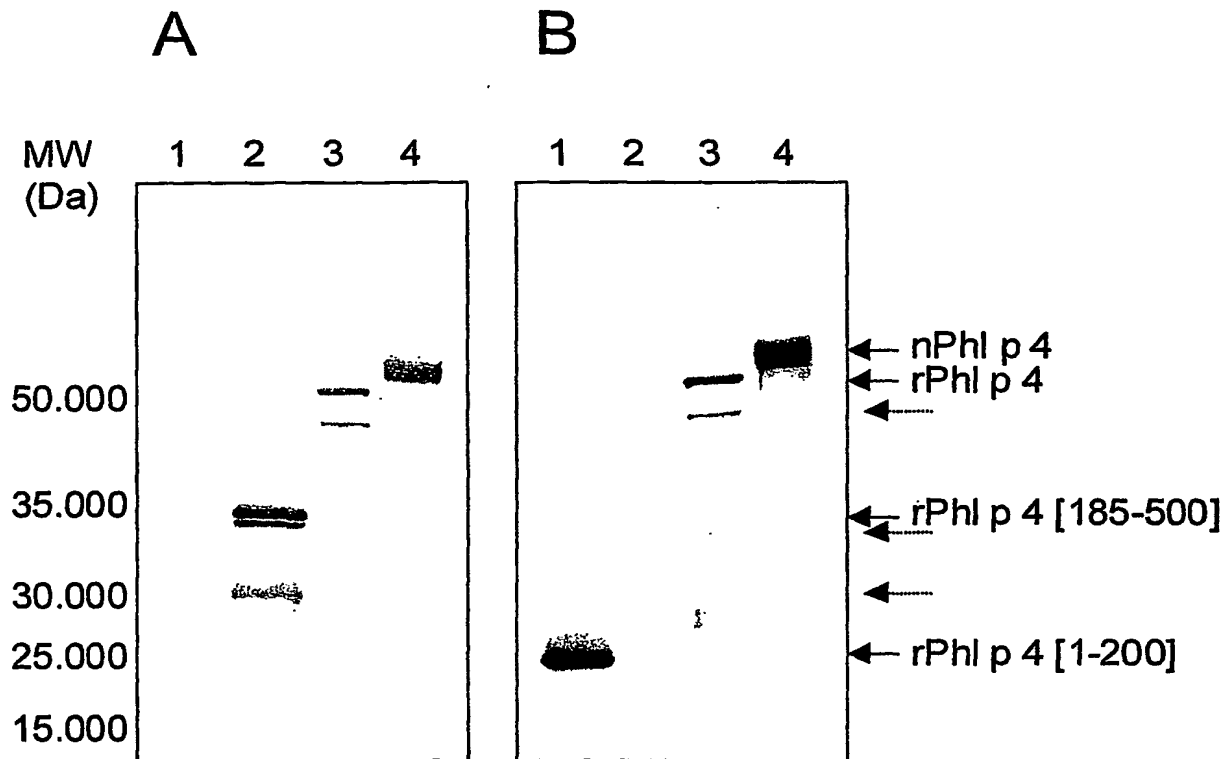
201 F W A V R G G G G E S F G I V V A W K V R L L P V P P T V T V F K I P K K A S E  
F X A V R A P E  
 241 G A V D I I N R W Q V V A P Q L P D D L M I R V I A Q G P T A T F E A M Y L G T  
G A V D I I  
**Peptid P5**

281 C Q T L T P M M S S K F P E L G M N A S H C N E M S W I Q S I P F V H L G H R D  
 321 N I E D D L L N R N N T F K P F A E Y K S D Y V Y E P F P K R V W E Q I F S T W  
 361 L L K P G A G I M I F D P Y G A T I S A T P E W A T P F P H R K G V L F N I Q Y  
S A T P F X H R K G V L F N I Q Y  
**Peptid P2**

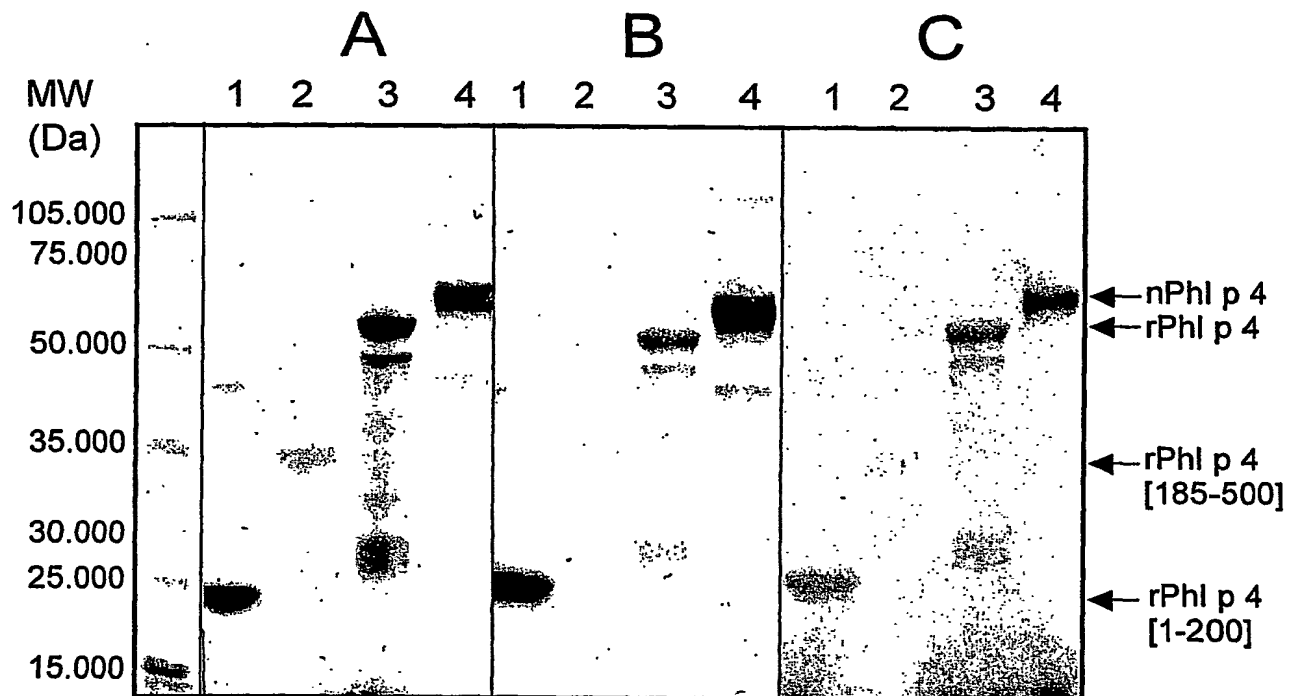
401 V N Y W F A P G A G A A P L S W S K E I Y N Y M E P Y V S K N P R Q A Y A N Y R  
V M E P Y V S I N P V Q A Y A N Y  
**Peptid P6**

441 D I D L G R N E V V N D V S T F S S G L V W G Q K Y F K G N F Q R L A I T K G K  
 481 V D P T D Y F R N E Q S I P P L I K K Y .

**Abb. 4** Nachweis der Identität des rekombinanten Phl p 4 (rPhl p 4) mittels der für nPhl p 4 spezifischen monoklonalen Antikörper 5H1 (Blot A) und 3C4 (Blot B) im Western Blot



**Abb. 5: Nachweis der Reaktivität des rekombinanten Phl p 4 (rPhl p 4) mit IgE aus Seren von Graspollenallergikern im Western Blot**



**Sequenz-Protokoll**

<110> Merck Patent GmbH

<120> DNA-Sequenz und rekombinante Herstellung des Graspollen-Allergens  
Phl p 4

<130> P 02/101

<140> EP 02 013953.1

<141> 2002-06-25

<160> 52

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1503

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial\_DNA\_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein

<220>

<221> native\_DNA\_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

- 2 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1503)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 1

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val	
1 5 10 15	
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr	
20 25 30	
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg cgg tgg tcg tcg ccg	144
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro	
35 40 45	
gac aac gtg aag ccg atc tac atc gtc acc ccc acc aac gcc tcc cac	192
Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His	
50 55 60	
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgg cac ggt gtc cgc atc cgc	240
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg	
65 70 75 80	
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg tcc ctg	288
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu	
85 90 95	
cag ccc gag gag ttc gcc gtc gtc gac ctt agc aag atg cgg gcc gtg	336
Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val	
100 105 110	
tgg gtg gac ggg aag gcc cgc acg cgc tgg gtc gac tcc ggc gcg cag	384
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln	
115 120 125	
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc cac aag gcg agt aca gtg ctg gcg	432
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Thr Val Leu Ala	
130 135 140	
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acc atc ggc gtg ggc ggc aac ttc gcg	480
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala	
145 150 155 160	
ggc ggc ggc ttc ggc atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcg gcc gag	528
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu	
165 170 175	
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc acg ctg cac gac	576
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp	
180 185 190	
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggc	624
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly	
195 200 205	

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg aag gtg agg ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg ccg ccc acg gtg acc gtg ttc aag atc ccc aag aag gcg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac agg tgg cag gtg gtc gcg ccg cag ctc Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gac gac ctc atg atc cgc gtc atc gcg cag ggc ccc acg gcc acg Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctg ggc acc tgc caa acc ctg acg ccg atg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met 275 280 285	864
agc agc aag ttc ccg gag ctc ggc atg aac gcc tcg cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912
atg tcg tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp 305 310 315 320	960
aac atc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac acc ttc aag ccc ttc Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008
gcc gaa tac aag tcg gac tac gtc tac gag ccg ttc ccc aag agg gtg Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Arg Val 340 345 350	1056
tgg gag cag atc ttc agc acc tgg ctc ctg aag ccc ggc gcg ggg atc Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tgg Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp 370 375 380	1152
gcg acg ccg ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc ggc gcg gcg cca ttg tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248
agc aag gag atc tac aac tac atg gag cca tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296
agg cag gcc tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344
gtg gtg aac gac gtc tcc acc ttc agc agc ggt ttg gtg tgg ggc cag	1392

- 4 -

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln  
 450 455 460

aaa tac ttc aag ggc aat ttc cag agg ctc gcc atc acc aag ggc aag 1440  
 Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys  
 465 470 475 480

gtg gat ccc acc gac tac ttc agg aac gag cag agc atc ccg ccg ctc 1488  
 Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu  
 485 490 495

atc aaa aag tac tga 1503  
 Ile Lys Lys Tyr  
 500

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 2

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val  
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr  
 20 25 30

Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro  
 35 40 45

Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His  
 50 55 60

Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg  
 65 70 75 80

Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu  
 85 90 95

Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val  
 100 105 110

Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln  
 115 120 125

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Thr Val Leu Ala  
 130 135 140

- 5 -

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala  
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu  
 165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp  
 180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly  
 195 200 205

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro  
 210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu  
 225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu  
 245 250 255

Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr  
 260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met  
 275 280 285

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu  
 290 295 300

Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp  
 305 310 315 320

Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe  
 325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Arg Val  
 340 345 350

Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile  
 355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp  
 370 375 380



- 6 -

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr  
385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp  
405 410 415

Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro  
420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu  
435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln  
450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys  
465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu  
485 490 495

Ile Lys Lys Tyr  
500

<210> 3

<211> 1503

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial\_DNA\_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein

<220>

<221> native\_DNA\_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

- 7 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1503)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 3

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val	
1 5 10 15	
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr	
20 25 30	
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc ccg aac tcg ccg tgg tcg tcg ccg	144
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro	
35 40 45	
gac aac gtg aag ccg atc tac atc gtc acc ccc acc aac gcc tcc cac	192
Asp Asn Val Lys Pro Ile Tyr Ile Val Thr Pro Thr Asn Ala Ser His	
50 55 60	
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc ccg cac ggt gtc cgc atc cgc	240
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Gly Val Arg Ile Arg	
65 70 75 80	
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac ccg tcc ctg	288
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu	
85 90 95	
cag ccc gag gag ttc gcc gtc gtc gac ctt agc aag atg ccg gcc gtg	336
Gln Pro Glu Glu Phe Ala Val Val Asp Leu Ser Lys Met Arg Ala Val	
100 105 110	
tgg gtg gac ggg aag gcc cgc acg gcg tgg gtc gac tcc ggc gcg cag	384
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln	
115 120 125	
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc cac aag gcg agt cca gtg ctg gcg	432
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile His Lys Ala Ser Pro Val Leu Ala	
130 135 140	
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acc atc ggc gtg ggc ggc aac ttc gcg	480
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala	
145 150 155 160	
ggc ggc ggc ttc ggc atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcg gcc gag	528
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu	
165 170 175	
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc acg ctg cac gac	576
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp	
180 185 190	
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggc	624
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly	
195 200 205	

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg aag gtg agg ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg ccg ccc acg gtg acc gtg ttc aag atc ccc aag aag gcg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac agg tgg cag gtg gtc gcg ccg cag ctc Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gac gac ctc atg atc cgc gtc atc gcg cag ggc ccc acg gcc acg Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctg ggc acc tgc caa acc ctg acg ccg atg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met 275 280 285	864
agc agc aag ttc ccc gag ctc ggc atg aac gcc tcg cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912
atg tcg tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp 305 310 315 320	960
aac atc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac acc ttc aag ccc ttc Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008
gcc gaa tac aag tcg gac tac gtc tac gag ccg ttc ccc aag gaa gtg Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Glu Val 340 345 350	1056
tgg gag cag atc ttc agc acc tgg ctc ctg aag ccc ggc gcg ggg atc Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tgg Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp 370 375 380	1152
gcg acg ccg ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc ggc gcg gcg cca ttg tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248
agc aag gag atc tac aac tac atg gag cca tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296
agg cag gcc tac gcc aac tac agg gac atc gac ctc ggg agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344
gtg gtg aac gac gtc tcc acc ttc agc agc ggt ttg gtg tgg ggc cag	1392

- 9 -

Val	Val	Asn	Asp	Val	Ser	Thr	Phe	Ser	Ser	Gly	Leu	Val	Trp	Gly	Gln		
450						455					460						
aaa	tac	ttc	aag	ggc	aat	ttc	cag	agg	ctc	gcc	atc	acc	aag	ggc	aag	1440	
Lys	Tyr	Phe	Lys	Gly	Asn	Phe	Gln	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Lys	Gly	Lys		
465					470					475					480		
gtg	gat	ccc	acc	gac	tac	ttc	agg	aac	gag	cag	agc	atc	ccg	ccg	ctc	1488	
Val	Asp	Pro	Thr	Asp	Tyr	Phe	Arg	Asn	Glu	Gln	Ser	Ile	Pro	Pro	Leu		
				485					490						495		
atc	aaa	aag	tac	tga												1503	
Ile	Lys	Lys	Tyr														
				500													

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 4

Tyr	Phe	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Lys	Glu	Asp	Phe	Leu	Gly	Cys	Leu	Val		
1				5					10					15			
Lys	Glu	Ile	Pro	Pro	Arg	Leu	Leu	Tyr	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Ala	Tyr		
			20					25					30				
Pro	Ser	Val	Leu	Gly	Gln	Thr	Ile	Arg	Asn	Ser	Arg	Trp	Ser	Ser	Pro		
		35					40					45					
Asp	Asn	Val	Lys	Pro	Ile	Tyr	Ile	Val	Thr	Pro	Thr	Asn	Ala	Ser	His		
		50				55					60						
Ile	Gln	Ser	Ala	Val	Val	Cys	Gly	Arg	Arg	His	Gly	Val	Arg	Ile	Arg		
65					70					75					80		
Val	Arg	Ser	Gly	Gly	His	Asp	Tyr	Glu	Gly	Leu	Ser	Tyr	Arg	Ser	Leu		
				85					90						95		
Gln	Pro	Glu	Glu	Phe	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Met	Arg	Ala	Val		
			100					105					110				
Trp	Val	Asp	Gly	Lys	Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln		
		115					120					125					
Leu	Gly	Glu	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Ile	His	Lys	Ala	Ser	Pro	Val	Leu	Ala		
		130				135						140					

- 10 -

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala  
145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu  
165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Thr Leu His Asp  
180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly  
195 200 205

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Lys Val Arg Leu Leu Pro  
210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Val Phe Lys Ile Pro Lys Lys Ala Ser Glu  
225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Arg Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu  
245 250 255

Pro Asp Asp Leu Met Ile Arg Val Ile Ala Gln Gly Pro Thr Ala Thr  
260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Gln Thr Leu Thr Pro Met Met  
275 280 285

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Ala Ser His Cys Asn Glu  
290 295 300

Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp  
305 310 315 320

Asn Ile Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Thr Phe Lys Pro Phe  
325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Glu Pro Phe Pro Lys Glu Val  
340 345 350

Trp Glu Gln Ile Phe Ser Thr Trp Leu Leu Lys Pro Gly Ala Gly Ile  
355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Trp  
370 375 380

- 11 -

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr  
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Gly Ala Ala Pro Leu Ser Trp  
 405 410 415

Ser Lys Glu Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro  
 420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu  
 435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Phe Ser Ser Gly Leu Val Trp Gly Gln  
 450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Gln Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys  
 465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu  
 485 490 495

Ile Lys Lys Tyr  
 500

<210> 5

<211> 1503

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<220>

<221> artificial\_DNA\_sequence

<222> (1)..(69)

<223> DNA sequence derived from sequenced protein

<220>

<221> native\_DNA\_sequence

<222> (70)..(1503)

<223>

- 12 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1503)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 5

tac ttc ccg ccg ccg gct gct aaa gaa gac ttc ctg ggt tgc ctg gtt	48
Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val	
1 5 10 15	
aaa gaa atc ccg ccg cgt ctg ttg tac gcg aaa tcg tcg ccg gcg tat	96
Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr	
20 25 30	
ccc tca gtc ctg ggg cag acc atc cgg aac tcg agg tgg tcg tcg ccg	144
Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro	
35 40 45	
gac aac gtg aag ccg ctc tac atc atc acc ccc acc aac gtc tcc cac	192
Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His	
50 55 60	
atc cag tcc gcc gtg gtg tgc ggc cgc cgc cac agc gtc cgc atc cgc	240
Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg	
65 70 75 80	
gtg cgc agc ggc ggg cac gac tac gag ggc ctc tcg tac cgg tct ttg	288
Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu	
85 90 95	
cag ccc gag acg ttc gcc gtc gtc gac ctc aac aag atg cgg gcg gtg	336
Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val	
100 105 110	
tgg gtg gac ggc aag gcc cgc acg gcg tgg gtg gac tcc ggc gcg cag	384
Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln	
115 120 125	
ctc ggc gag ctc tac tac gcc atc tat aag gcg agc ccc acg ctg gcg	432
Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala	
130 135 140	
ttc ccg gcc ggc gtg tgc ccg acg atc gga gtg ggc ggc aac ttc gcg	480
Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala	
145 150 155 160	
ggc ggc ggc ttc ggc atg ctg ctg cgc aag tac ggc atc gcc gcg gag	528
Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu	
165 170 175	
aac gtc atc gac gtg aag ctc gtc gac gcc aac ggc aag ctg cac gac	576
Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp	
180 185 190	
aag aag tcc atg ggc gac gac cat ttc tgg gcc gtc agg ggc ggc ggg	624
Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly	
195 200 205	

- 13 -

ggc gag agc ttc ggc atc gtg gtc gcg tgg cag gtg aag ctc ctg ccg Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro 210 215 220	672
gtg ccg ccc acc gtg aca ata ttc aag atc tcc aag aca gtg agc gag Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu 225 230 235 240	720
ggc gcc gtg gac atc atc aac aag tgg caa gtg gtc gcg ccg cag ctt Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu 245 250 255	768
ccc gcc gac ctc atg atc cgc atc atc gcg cag ggg ccc aag gcc acg Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr 260 265 270	816
ttc gag gcc atg tac ctc ggc acc tgc aaa acc ctg acg ccg ttg atg Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met 275 280 285	864
agc agc aag ttc ccg gag ctc ggc atg aac ccc tcc cac tgc aac gag Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu 290 295 300	912
atg tca tgg atc cag tcc atc ccc ttc gtc cac ctc ggc cac agg gac Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp 305 310 315 320	960
gcc ctc gag gac gac ctc ctc aac cgg aac aac tcc ttc aag ccc ttc Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe 325 330 335	1008
gcc gaa tac aag tcc gac tac gtc tac cag ccc ttc ccc aag acc gtc Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val 340 345 350	1056
tgg gag cag atc ctc aac acc tgg ctc gtc aag ccc ggc gcc ggg atc Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile 355 360 365	1104
atg atc ttc gac ccc tac ggc gcc acc atc agc gcc acc ccg gag tcc Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser 370 375 380	1152
gcc acg ccc ttc cct cac cgc aag ggc gtc ctc ttc aac atc cag tac Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr 385 390 395 400	1200
gtc aac tac tgg ttc gcc ccg gga gcc gcc gcc gcg ccc ctc tcg tgg Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp 405 410 415	1248
agc aag gac atc tac aac tac atg gag ccc tac gtg agc aag aac ccc Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro 420 425 430	1296
agg cag gcg tac gca aac tac agg gac atc gac ctc ggc agg aac gag Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu 435 440 445	1344
gtg gtc aac gac gtc tcc acc tac gcc agc ggc aag gtc tgg ggc cag	1392



- 14 -

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln  
 450 455 460  
 aaa tac ttc aag ggc aac ttc gag agg ctc gcc att acc aag ggc aag 1440  
 Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys  
 465 470 475 480  
 gtc gat cct acc gac tac ttc agg aac gag cag agc atc ccg ccg ctc 1488  
 Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu  
 485 490 495  
 atc aaa aag tac tga 1503  
 Ile Lys Lys Tyr  
 500

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 500

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 6

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Cys Leu Val  
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr  
 20 25 30

Pro Ser Val Leu Gly Gln Thr Ile Arg Asn Ser Arg Trp Ser Ser Pro  
 35 40 45

Asp Asn Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Thr Asn Val Ser His  
 50 55 60

Ile Gln Ser Ala Val Val Cys Gly Arg Arg His Ser Val Arg Ile Arg  
 65 70 75 80

Val Arg Ser Gly Gly His Asp Tyr Glu Gly Leu Ser Tyr Arg Ser Leu  
 85 90 95

Gln Pro Glu Thr Phe Ala Val Val Asp Leu Asn Lys Met Arg Ala Val  
 100 105 110

Trp Val Asp Gly Lys Ala Arg Thr Ala Trp Val Asp Ser Gly Ala Gln  
 115 120 125

Leu Gly Glu Leu Tyr Tyr Ala Ile Tyr Lys Ala Ser Pro Thr Leu Ala  
 130 135 140

- 15 -

Phe Pro Ala Gly Val Cys Pro Thr Ile Gly Val Gly Gly Asn Phe Ala  
 145 150 155 160

Gly Gly Gly Phe Gly Met Leu Leu Arg Lys Tyr Gly Ile Ala Ala Glu  
 165 170 175

Asn Val Ile Asp Val Lys Leu Val Asp Ala Asn Gly Lys Leu His Asp  
 180 185 190

Lys Lys Ser Met Gly Asp Asp His Phe Trp Ala Val Arg Gly Gly Gly  
 195 200 205

Gly Glu Ser Phe Gly Ile Val Val Ala Trp Gln Val Lys Leu Leu Pro  
 210 215 220

Val Pro Pro Thr Val Thr Ile Phe Lys Ile Ser Lys Thr Val Ser Glu  
 225 230 235 240

Gly Ala Val Asp Ile Ile Asn Lys Trp Gln Val Val Ala Pro Gln Leu  
 245 250 255

Pro Ala Asp Leu Met Ile Arg Ile Ile Ala Gln Gly Pro Lys Ala Thr  
 260 265 270

Phe Glu Ala Met Tyr Leu Gly Thr Cys Lys Thr Leu Thr Pro Leu Met  
 275 280 285

Ser Ser Lys Phe Pro Glu Leu Gly Met Asn Pro Ser His Cys Asn Glu  
 290 295 300

Met Ser Trp Ile Gln Ser Ile Pro Phe Val His Leu Gly His Arg Asp  
 305 310 315 320

Ala Leu Glu Asp Asp Leu Leu Asn Arg Asn Asn Ser Phe Lys Pro Phe  
 325 330 335

Ala Glu Tyr Lys Ser Asp Tyr Val Tyr Gln Pro Phe Pro Lys Thr Val  
 340 345 350

Trp Glu Gln Ile Leu Asn Thr Trp Leu Val Lys Pro Gly Ala Gly Ile  
 355 360 365

Met Ile Phe Asp Pro Tyr Gly Ala Thr Ile Ser Ala Thr Pro Glu Ser  
 370 375 380

- 16 -

Ala Thr Pro Phe Pro His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Tyr  
 385 390 395 400

Val Asn Tyr Trp Phe Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Pro Leu Ser Trp  
 405 410 415

Ser Lys Asp Ile Tyr Asn Tyr Met Glu Pro Tyr Val Ser Lys Asn Pro  
 420 425 430

Arg Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr Arg Asp Ile Asp Leu Gly Arg Asn Glu  
 435 440 445

Val Val Asn Asp Val Ser Thr Tyr Ala Ser Gly Lys Val Trp Gly Gln  
 450 455 460

Lys Tyr Phe Lys Gly Asn Phe Glu Arg Leu Ala Ile Thr Lys Gly Lys  
 465 470 475 480

Val Asp Pro Thr Asp Tyr Phe Arg Asn Glu Gln Ser Ile Pro Pro Leu  
 485 490 495

Ile Lys Lys Tyr  
 500

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Phleum pratense

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> undetermined amino acid

<400> 7

Ile Val Ala Leu Pro Xaa Gly Met Leu Lys  
 1 5 10

<210> 8

<211> 14

- 17 -

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lolium perenne

&lt;400&gt; 8

Phe	Leu	Glu	Pro	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Phe	Pro	Ala	Gly	Val
1				5					10				

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Lolium perenne

&lt;400&gt; 9

Gly	Leu	Ile	Glu	Phe	Pro	Ala	Gly	Val
1				5				

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Dactylus glomerata

&lt;400&gt; 10

Asp	Ile	Tyr	Asn	Tyr	Met	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys
1				5					10		

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Dactylus glomerata

&lt;400&gt; 11

Val	Asp	Pro	Thr	Asp	Tyr	Phe	Gly	Asn	Glu	Gln
1				5					10	

&lt;210&gt; 12

- 18 -

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Dactylus glomerata

&lt;400&gt; 12

Ala	Arg	Thr	Ala	Trp	Val	Asp	Ser	Gly	Ala	Gln	Leu	Gly	Glu	Leu	Ser
1				5					10					15	

Tyr

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Dactylus glomerata

&lt;400&gt; 13

Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln	Tyr	Val	Asn	Tyr	Trp	Phe	Ala	Pro
1				5					10					15

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 14

Lys	Thr	Val	Lys	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ile	Thr	Pro
1				5					10	

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 15

- 19 -

Lys Gln Val Glu Arg Asp Phe Leu Thr Ser Leu Thr Lys Asp Ile Pro  
1 5 10 15

Gln Leu Tyr Leu Lys Ser  
20

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 16

Thr Val Lys Pro Leu Tyr Ile Ile Thr Pro Ile Thr Ala Ala Met Ile  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 17

Leu Arg Lys Tyr Gly Thr Ala Ala Asp Asn Val Ile Asp Ala Lys Val  
1 5 10 15

Val Asp Ala Gln Gly Arg Leu Leu  
20

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 18

Lys Trp Gln Thr Val Ala Pro Ala Leu Pro Asp Pro Asn Met  
1 5 10

&lt;210&gt; 19

- 20 -

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 19

Val	Thr	Trp	Ile	Glu	Ser	Val	Pro	Tyr	Ile	Pro	Met	Gly	Asp	Lys
1				5					10					15

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (8)..(8)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 20

Gly	Thr	Val	Arg	Gln	Leu	Leu	Xaa	Arg	Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ala	Phe
1				5					10					15	

Gly Lys Tyr

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 21

Thr	Ser	Asn	Ile	Lys	Ala	Phe	Gly	Lys	Tyr	Lys	Ser	Asp	Tyr	Val	Leu
1				5					10					15	

Glu	Pro	Ile	Pro	Lys	Lys	Ser
			20			

- 21 -

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 13

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 22

Tyr	Arg	Asp	Leu	Asp	Leu	Gly	Val	Asn	Gln	Val	Val	Gly
1				5					10			

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 23

Ser	Ala	Thr	Pro	Pro	Thr	His	Arg	Ser	Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile
1				5					10				15	

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Cynodon dactylon

&lt;400&gt; 24

Ala	Ala	Ala	Ala	Leu	Pro	Thr	Gln	Val	Thr	Arg	Asp	Ile	Tyr	Ala	Phe
1				5					10					15	

Met	Thr	Pro	Tyr	Val	Ser	Lys	Asn	Pro	Arg	Gln	Ala	Tyr	Val	Asn	Tyr
			20					25					30		

Arg	Asp	Leu	Asp
		35	

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 149



- 22 -

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

<400> 25  
 caccggaagg ggggtgctgtt caacatccag tacgtcaact actggttcgc cccgggagcc 60  
 ggcgcggcgc cattgtcgtg gagcaaggag atctacaact acatggagcc gtacgtgagc 120  
 aaggacccccg tccaggccta cgccaacta 149

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 299

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

<400> 26  
 actactggtt cgccccggga gccggcgcg ggcattgtc gtggagcaag gagatctaca 60  
 actacatgga gccatacgtg agcaagaacc ccaggcaggc ctacgccaac tacagggaca 120  
 tcgacctcgg gaggaacgag gtggtgaacg acgtctccac cttcagcagc ggtttggtgt 180  
 ggggccagaa atacttcaag ggcaacttcc agaggctcgc catcaccaag ggcaaggtgg 240  
 atcccaccga ctacttcagg aacgagcaga gcatcccgcc gctcatcaaa aagtactga 299

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (14)..(14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 27

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu Val  
 1 5 10 15

- 23 -

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr  
                   20                                  25                                  30

Pro

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (6)..(6)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 28

Ser Ala Thr Pro Phe Xaa His Arg Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln  
   1                  5                                  10                                  15

Tyr Val

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (3)..(8)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 29

Gly Leu Xaa Tyr Arg Xaa Leu Xaa Pro Glu  
   1                  5                                  10

- 24 -

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (2)..(9)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 30

Lys Xaa Met Gly Asp Asp His Phe Xaa Ala Val Arg  
1 5 10

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 31

Ala Pro Glu Gly Ala Val Asp Ile Ile  
1 5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 32

Met Glu Pro Tyr Val Ser Ile Asn Pro Val Gln Ala Tyr Ala Asn Tyr  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 33

- 25 -

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (14)..(14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 33

Tyr	Phe	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Lys	Glu	Asp	Phe	Leu	Gly	Xaa	Leu
1				5				10						15

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 34

Leu	Tyr	Ala	Lys	Ser	Ser	Pro	Ala	Tyr	Pro
1				5				10	

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (14)..(14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 35

- 26 -

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu Val  
1 5 10 15

Lys Glu Ile Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro Ala Tyr  
20 25 30

Pro

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (14) .. (14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 36

Tyr Phe Pro Pro Pro Ala Ala Lys Glu Asp Phe Leu Gly Xaa Leu Val  
1 5 10 15

Lys Glu Pro Pro Arg Leu Leu Tyr Ala Lys Ser Ser Pro  
20 25

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (4) .. (14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

- 27 -

&lt;400&gt; 37

Tyr	Phe	Pro	Xaa	Xaa	Ala	Ala	Lys	Glu	Asp	Phe	Leu	Gly	Xaa	Leu
1				5					10					15

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (4)..(14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 38

Tyr	Phe	Pro	Xaa	Xaa	Ala	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Leu	Gly	Xaa	Leu
1				5					10					15

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (4)..(14)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 39

Tyr	Phe	Pro	Xaa	Xaa	Ala	Ala	Lys	Asp	Asp	Phe	Leu	Gly	Xaa	Leu
1				5					10					15

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 11

- 28 -

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (4)..(5)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 40

Tyr	Phe	Pro	Xaa	Xaa	Leu	Ala	Asn	Glu	Asp	Phe
1				5					10	

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (6)..(6)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 41

Ser	Ala	Thr	Pro	Phe	Xaa	His	Arg	Lys	Gly	Val	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln
1				5					10					15	

Tyr Val

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

- 29 -

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (3)..(8)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 42

Gly	Leu	Xaa	Tyr	Arg	Xaa	Leu	Xaa	Pro	Glu
1				5					10

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (2)..(9)

&lt;223&gt; undetermined amino acid

&lt;400&gt; 43

Lys	Xaa	Met	Gly	Asp	Asp	His	Phe	Xaa	Ala	Val	Arg
1				5					10		

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense.

&lt;400&gt; 44

Ala	Pro	Glu	Gly	Ala	Val	Asp	Ile	Ile
1				5				

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 16



- 30 -

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 45

Met	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Ile	Asn	Pro	Val	Gln	Ala	Tyr	Ala	Asn	Tyr
1				5				10						15	

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt; 'n' means inosin

&lt;400&gt; 46

ytntaygcna arwsnwsncc ngcntaycc

29

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(28)

&lt;223&gt; 'n' means inosin

&lt;400&gt; 47

caymgnaarg gngtnytntt yaayatmc

28

&lt;210&gt; 48

- 31 -

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(26)

&lt;223&gt; 'n' means inosin

&lt;400&gt; 48

tarttngcrt angcytnac nggrtt

26

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 49

actactgggt cgccccggga gcc

23

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 50

tgaagtattt ctggccccac accaaacc

28

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phleum pratense

&lt;400&gt; 51

cccttggtga tggcgagcct ctgg

24

- 32 -

<210> 52

<211> 23

<212> DNA

<213> Phleum pratense

<400> 52

ctcagtcctg gggcagacca tcc

23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06092

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/415 C12N15/11 C12N15/63 A61K38/16 A61K39/36  
A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SUCK R ET AL: "The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (Phleum pratense) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 30, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1395-1402, XP002260344</p> <p>ISSN: 0954-7894</p> <p>cited in the application</p> <p>page 1396, left-hand column, last paragraph -right-hand column, paragraph 1</p> <p>page 1397, left-hand column, paragraph 3; figure 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-20



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 November 2003

Date of mailing of the international search report

17/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brenz Verca, S

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/06092

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>FISHER S ET AL: "Characterization of Phl p4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen"</p> <p>JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, vol. 98, no. 1, July 1996 (1996-07), pages 189-198, XP000953216</p> <p>ISSN: 0091-6749</p> <p>cited in the application</p> <p>page 191, left-hand column, paragraphs 2,3; figure 4</p>	1-20
X	<p>FAHLBUSCH B ET AL: "Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, vol. 28, no. 7, July 1998 (1998-07), pages 799-807, XP002260345</p> <p>ISSN: 0954-7894</p> <p>cited in the application</p>	13
X	<p>page 801, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-page 802, left-hand column, paragraph 1;</p> <p>figure 1A</p>	13
A	the whole document	
A	<p>SUCK R ET AL: "COMPLEMENTARY DNA CLONING AND EXPRESSION OF A NEWLY RECOGNIZED HIGHMOLECULAR MASS ALLERGEN PHL P 13 FROM TIMOTHY GRASS POLLEN (PHLEUM PRATENSE)"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, LONDON, GB, vol. 30, no. 3, March 2000 (2000-03), pages 324-332, XP000953168</p> <p>ISSN: 0954-7894</p> <p>cited in the application</p> <p>page 325, right-hand column, paragraph 2</p> <p>-page 326, left-hand column, paragraph 2;</p> <p>figure 1B</p>	1-13
P,X	<p>STUMVOLL SABINE ET AL: "Purification, structural and immunological characterization of a timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen, Phl p 4, with cross-reactive potential."</p> <p>BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 383, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 1383-1396, XP002260346</p> <p>ISSN: 1431-6730</p> <p>cited in the application</p> <p>the whole document</p>	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/06

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 6 - 8  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
See supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## BOX II

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely:

1. Claims: 1-20

subject matter of Claims 1-20, insofar as it relates to the nucleotide sequence of SEQ ID No.: 1 and the polypeptide of SEQ ID No.: 2 encoded thereby.

2. Claims: 1-20

subject matter of Claims 1-20, insofar as it relates to the nucleotide sequence of SEQ ID No.: 3 and the polypeptide of SEQ ID No.: 4 encoded thereby.

3. Claims: 1-20

subject matter of Claims 1-20, insofar as it relates to the nucleotide sequence of SEQ ID No.: 5 and the polypeptide of SEQ ID No.: 6 encoded thereby.

## Continuation of I.2

Claims: 6, 8

The current Claim 6 relates to a DNA molecule characterized as a partial sequence or combination of partial sequences of the DNA molecule that codes the major allergen Phl p4. The DNA molecule is further characterized by a desirable property of the coded Phl p4 fragment, namely an immunomodulatory T-cell reactive activity.

The claims therefore encompass all fragment-encoding DNA molecules of indefinite length that have this characteristic or property, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for only a limited number of such products. In the present case the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the molecule in terms of the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope of protection sought.

Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning the DNA molecules according to Claim 7, supported by the examples given by Figures 4 and 5.

Analogously, the search for the DNA molecule of Claim 8 was limited to the preferred embodiment according to Claim 9. The DNA molecule of Claim 8 is also defined by a desirable property, the immunomodulatory T-cell reactive activity of the coded fragment, without disclosure of the specific technical features required for realizing this property (PCT Article 6).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination

(PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/06092

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSSTANDES

IPK 7 C07K14/415 C12N15/11 C12N15/63 A61K38/16 A61K39/36  
A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C07K C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>SUCK R ET AL: "The high molecular mass allergen fraction of timothy grass pollen (Phleum pratense) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, Bd. 30, Nr. 10, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 1395-1402, XP002260344</p> <p>ISSN: 0954-7894</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Seite 1396, linke Spalte, letzter Absatz</p> <p>-rechte Spalte, Absatz 1</p> <p>Seite 1397, linke Spalte, Absatz 3;</p> <p>Abbildung 1</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. November 2003

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

17/11/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Brenz Verca, S

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESCHENNE UNTERLAGEN		
Kategorie <sup>o</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>FISHER S ET AL: "Characterization of Phl p4, a major timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen"</p> <p>JOURNAL OF ALLERGY AND CLINICAL IMMUNOLOGY, MOSBY - YEARLY BOOK, INC, US, Bd. 98, Nr. 1, Juli 1996 (1996-07), Seiten 189-198, XP000953216</p> <p>ISSN: 0091-6749</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Seite 191, linke Spalte, Absätze 2,3; Abbildung 4</p>	1-20
X	<p>FAHLBUSCH B ET AL: "Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, Bd. 28, Nr. 7, Juli 1998 (1998-07), Seiten 799-807, XP002260345</p> <p>ISSN: 0954-7894</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p>	13
X	Seite 801, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 802, linke Spalte, Absatz 1; Abbildung 1A	13
A	das ganze Dokument	
A	<p>SUCK R ET AL: "COMPLEMENTARY DNA CLONING AND EXPRESSION OF A NEWLY RECOGNIZED HIGHMOLECULAR MASS ALLERGEN PHL P 13 FROM TIMOTHY GRASS POLLEN (PHLEUM PRATENSE)"</p> <p>CLINICAL AND EXPERIMENTAL ALLERGY, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, LONDON, GB, Bd. 30, Nr. 3, März 2000 (2000-03), Seiten 324-332, XP000953168</p> <p>ISSN: 0954-7894</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Seite 325, rechte Spalte, Absatz 2 -Seite 326, linke Spalte, Absatz 2; Abbildung 1B</p>	1-13
P,X	<p>STUMVOLL SABINE ET AL: "Purification, structural and immunological characterization of a timothy grass (Phleum pratense) pollen allergen, Phl p 4, with cross-reactive potential."</p> <p>BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 383, Nr. 9, September 2002 (2002-09), Seiten 1383-1396, XP002260346</p> <p>ISSN: 1431-6730</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>das ganze Dokument</p>	1-20

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 6 8  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☒ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

1. Ansprüche: 1-20

Gegenstand der Ansprüche 1-20, sofern es die Nukleotidsequenz von SEQ ID No:1 und das davon kodierte Polypeptid von SEQ ID No:2 betrifft.

2. Ansprüche: 1-20

Gegenstand der Ansprüche 1-20, sofern es die Nukleotidsequenz von SEQ ID No:3 und das davon kodierte Polypeptid von SEQ ID No:4 betrifft.

3. Ansprüche: 1-20

Gegenstand der Ansprüche 1-20, sofern es die Nukleotidsequenz von SEQ ID No:5 und das davon kodierte Polypeptid von SEQ ID No:6 betrifft.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 6 8

Der Patentanspruch 6 bezieht sich auf ein DNA-Molekül, charakterisiert als Teilsequenz oder Kombination von Teilsequenzen des DNA-Moleküls, das das Majorallergen Phl p4 kodiert. Ferner ist das DNA-Molekül dadurch charakterisiert, dass das kodierte Phl p 4 Fragment eine erstrebenswerte Eigenschaft haben soll, nämlich eine immunomodulatorische, T-Zell-reaktive Aktivität.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Fragment-kodierende DNA-Moleküle unbestimmter Länge, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Molekül über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die DNA-Moleküle gemäß Anspruch 7, unterstützt durch die Beispiele von Abbildung 4 und 5.

In Analogie, wurde die Recherche für das DNA-Molekül von Anspruch 8 auf die bevorzugte Ausführungsform gemäß Anspruch 9 beschränkt. Das DNA-Molekül von Anspruch 8 ist nämlich auch durch eine erstrebenswerte Eigenschaft definiert, nämlich die immunomodulatorische T-Zell-reaktive Aktivität des kodierten Fragments, ohne dass die nötigen konkreten technischen Merkmale zum Erreichen dieser Eigenschaft offenbart sind (A6 PCT).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.